# دراسات وراثية علي الإستجابة المناعية في بعض حيوانات التجارب لفاكسين الحمض النووي المعزول من بكتيريا الباستريلا مالتوسيدا الممرضة

رسالة مقدمة من

**آيات أحمد عمر طلب**

ماجستيرفي العلوم الزراعية تخصص وراثة–كلية الزراعة – جامعة الفيوم

كجزء من متطلبات الحصول على

**درجة الدكتوراة في العلوم الزراعية**

**تخصص (وراثة)**

قسم الوراثة

كلية الزراعة

**جامعة الفيوم**

**٢٠١٨**

# دراسات وراثية علي الإستجابة المناعية في بعض حيوانات التجارب لفاكسين الحمض النووي المعزول من بكتيريا الباستريلا مالتوسيدا الممرضة


مقدمة من

**آيات أحمد عمر طلب**

بكالوريوس فى العلوم الزراعية (إنتاج دواجن)

كلية الزراعة – جامعة الفيوم (٢٠٠٧)

ماجستير في العلوم الزراعية(وراثة)

كلية الزراعة – جامعة الفيوم(٢٠١٤)


**للحصول على درجة الدكتوراة في العلوم الزراعية**
**(وراثة)**

**لجنة الحكم والمناقشة**

**أ.د /محمد سراج الدين عبد الصبور**
أستاذالوراثة المتفرغ بكلية الزراعة - جامعة بنها

**أ.د / سمير عبد العزيز ابراهيم**
أستاذ الوراثة المتفرغ بكلية الزراعة - جامعة عين شمس

**أ.د / زكى أحمد عطية الفقى**
أستاذ الوراثة المتفرغ بكلية الزراعة -جامعة الفيوم

**أ.د/ جمال محمدين حسان**
أستاذ الوراثةكلية الزراعة-جامعة الفيوم

**تاريخ الموافقة/١١ / ٢٠١٨**

# دراسات وراثية علي الإستجابة المناعية في بعض حيوانات التجارب لفاكسين الحمض النووي المعزول من بكتيريا الباستريلا مالتوسيدا الممرضة

مقدمة من

**آيات أحمد عمر طلب**

للحصول على درجة

الدكتوراه في العلوم الزراعية

**(وراثة)**

**لجنة الإشراف العلمى:**

**أ.د / زكى أحمد عطية الفقى**
أستاذ الوراثة المتفرغ بكلية الزراعة-جامعة الفيوم

**أ.د/ جمال محمدين حسان**
أستاذ الوراثةبكلية الزراعة-جامعة الفيوم

**د/ أحمد عبد الفتاح محمد يس**
أستاذ الوراثة المساعد كلية الزراعة-جامعة الفيوم

# الملخص العربي


أجريت الدراسة الحالية في قسم الوراثة بكلية الزراعة - جامعة الفيوم - مصر خلال الفترة من ٢٠١٤ الي ٢٠١٨.في هذه الدراسة ، تم إختيار عشرة سلالات من بكتيريا *Pasteurella multocida*المعزولة من الدجاج والماشية والجاموس والأغنام بواسطة تفاعل ال PCR المتخصص لجينKMT1كذلك تم تحديد نوع الكبسولة للعشر سلالات من*P. multocida*باستخدام التفاعلات التقليدية والتي تضمنت اختبارacriflavine واختبارhyaluronidaseوكذلك استخدام تقنيات ال PCR. تم عزل جين *OmpH* والمسئول عن انتاج بروتين الغشاءالخارجي من السلالات العشر وتم اجراء إختبار PCR-RFLPلـل*OmpH*. كذلك تم كلونةالجين OmpHباستخدام البلازميد pUCP24 للحصول على البلازميد المهجن واستخدامه كلقاح جينيpUCP24-OmpH .

تم حقن أربعة مجاميع من الفئران (ن = ١٠ لكل مجموعة)intraperitoneally بالبلازميد المهجن بجين المناعة *OmpH*، البلازميد ، اللقاح التجاري والمحلول الفسيولوجي PBS على التوالي ثم تم تقييم الاستجابة المناعية والفعالية الوقائية بعد التحصين عن طريق تقدير كمية الأجسام المناعية (IgM و IgG).

وتهدف هذه الدراسة الي أنتاج لقاحمن الجينات المناعية المعزولة من سلالات الباستريلا مالتوسيدا لإستخدامه في برامج التحصين ضد مرض الالتهاب الرئوي ويمكن تلخيص النتائج التي تم الحصول عليها علي النحو التالي:

١- تم تأكيد تعريف السلالات البكتيرية المستخدمه بإستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل وفي وجود البادئات المتخصصة لنوع الباستريلا مالتوسيدا وبالفعل تم التأكيد علي أن السلالات البكتيرية المستخدمة تتبع بكتيريا *P. multocida* طبقا للوزن الجزيئ لجين KMT1والذي أظهر حزمة ذات حجم جزيئ ٤٦٠ زوج من القواعد وذلك للسلالات البكتيرية العشرة والمستخدمة في الدراسة.

٢- تحديد نوع الكبسولة للعشر سلالات من بكتيريا الباستريلا مالتوسيدا الممرضة المستخدمة في الدراسة وذلك بإستخدام الطرق التقليدية والتي تشمل اختبار صبغة Acriflavin وإختبار إنزيم الهيالورونيداز المنتج من بكتيريا ستافيلوكوكس وأوضحت نتائج إختبار الاكريفلافين أن سلالة واحدة من السلالات (١٠%) والتي تم عزلها من الدواجن أعطت نتيجة موجبة لنوع الكبسولة D في حين لم تظهر أي سلالة من السلالات العشر أي نتيجة إيجابية لإختبار الهيالورونيداز وعلي ذلك لم يتم تحديد طراز الكبسولة A في السلالات المستخدمة.

وبشكل عام فان الطريقة التقليدية لتحديد نوع الكبسولة تمكنت من تحديد نوع الكبسولة لسلالة واحدة فقط في حين بقيت السلالات التسعة الاخري بدون تحديد لنوع الكبسولة. تم تحديد نوع الكبسولة لسلالات الباستيريلا مالتوسيدا بإستخدام تفاعل ال-PCRحيث تم إجراء تفاعل البلمرة المتسلسل بإستخدام بواديء متخصصة لكل نوع من الأنواع الخمس للكبسولة وأوضحت نتائج الPCR سلالة واحدة ١٠% تنتمي للنوع F والتي تم عزلها من الماشية وسلالة واحدة تنتمي للنوع D والتي تم عزلها من الدواجن والثمانية الباقين ينتمون للنوع E وتم عزلهم من الابقار والجاموس والدواجن. وبإجراء تفاعل البلمرة

المتسلسل المتعدد بإستخدام الخمسة بواديء في تفاعل واحد تم تأكيد نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل بإستخدام كل باديء علي حدة حيث أظهرت النتائج أن نوع الكبسولة للسلالات البكتيرية المستخدمة في الدراسة تنتمي للانواع D, E and F.

٣- تم عزل إثنان من البلازميدات بأوزان جزيئية ٤ و٥ كيلو زوج من القواعد من كل من السلالات العشر المستخدمة في الدراسة مما يوضح أن جميع السلالات تحتوي علي بلازميدات ذات أنماط متشابهة.

٤- تم عزل الجين المناعي ( *OmpH*) المسئول عن حدوث العدوي من السلالات العشرة لبكتيريا الباستيريلا مالتوسيدا وذلك باستخدام تفاعل ال PCR وأظهرت صورة التفريد الكهربي لمنتج تفاعل الPCR علي هلام الاجاروز حزمة واحدة ذات وزن جزيئ ١٠٣٠ زوج من القواعد .

٥- تم تحديد تتابع الحمض النووي للجين المناعي *OmpH* باستخدام DNA sequencer وبعمل شجرة القرابة بين التتابعات النتحصل عليها وبين التتابعات المختلفة والمتاحة ببنك الجينات لكل سلالة بكتيرية علي حدة وجد ان التتابعات التي تم الحصول عليها تتشابه مع التتابعات المسجلة في قاعدة البيانات العالمية ببنك الجينات الخاص بسلالات الباستيريلا مالتوسيدا بنسبة تشابه ٩٩%.

٦- تم عمل التحليل العشوائي لقطع ال DNA باستخدام تقنية تحليل تعدد الاشكال لطول القطع الناتجهعن هضم ال DNA باستخدام انزيمات القطع المتخصصه (RFLP ) وذلك باستخدام نوعين مختلفين من انزيمات القطع المتخصصة واظهرت نتائج التقطيع باستخدام انزيم Msp1 ان الجين *OmpH*يحتوي علي مكان قطع واحد لجميع السلالات

ونتج عن ذلك قطعتين بوزن جزيئي ٣٨٠و ٥٨٠ زوج من القواعد . في حين أظهرت نتائج التحليل باستخدام انزيم القطع المتخصص *Bgl*II ان السلالات العشرة تم تقسيمهم الي مجموعتين المجموعة الاولي لم يتمكن انزيم القطع من احداث قطع في الجين*OmpH* حيث نتجت قطعة واحدة ذات وزن جزيئي ٧٠٠ زوج من القواعد في ستة من السلالات والمجموعة الثانية تضم الاربع سلالات الاخري حيث أظهرت نتائج التحليل قطعتين بأوزان جزيئية ٢٥٠و ٤٨٠ زوج من القواعد .وبذلك يمكن اعتبار تقنية RFLP أداة سريعة ومفيدة في عملية تعريف السلالات البكتيرية.

٧- تم كلونة الجين المناعي *OmpH* باستخدام pUCP24 expression vector واستزراعه في بكتيريـــا *E. coli* competent cells. وأمكن الحصول علي مستعمرات بكتيرية متحولة وراثيا ومحتوية علي البلازميد المهجن بالجين وتم الكشف عنها باستخدام اختبار X-gal و IPTG وكانت المستعمرات المستهدفة ذات اللون الابيض.كذلك تم عزل البلازميد المهجن *OmpH*-pUCP24 من المستعمرات البكتيرية ذات اللون الابيض والنامية علي بيئة LB حيث أظهر وزن جزيئي أعلي من الوزن الجزيء للبلازميد pUCP24.

٨- تم استخدام recombinant vectors كفاكسين لإحداث الاستجابة المناعية في عدد ٤٠ فأر من فئران التجارب حيث تم تقسيم حيوانات التجارب لأربع مجاميع كل مجموعة بها ١٠ فئران: المجموعة الضابطة تم حقنها ب ١٠٠ ميكروليتر من محلول ملحي PBS– المجموعة الثانية تم حقنها بتركيز ١٠٠ ميكروليتر من الفاكسين التجاري- المجموعة الثالثة تم حقنها ب ١٠٠ ميكروليتر من المحلول المحتوي علي البلازميد

المهجن بجين المناعة *OmpH* بتركيز ١٠٠ ميكروجرام/ مللي بالاضافة الي المجموعة الرابعة والتي تم حقنها ب ١٠٠ ميكروليتير من البلازميد pUCP24 .تم عمل تقييم للإستجابة المناعية في المجاميع الأربعة وذلك بقياس مستوي الأجسام المناعية IgG وIgM وأظهرت النتائج حدوث ارتفاع ملحوظ في نسبة الأجسام المضادة بعد الحقنة الأولي.

٩- تم حقن جميع الفئران المحصنة بعد عشرة أيام من الجرعة التحصينية الثانية وذلك ب ١٠٠ميكروليتر من سلالة الباستيريلا مالتوسيدا الممرضة ذات الطراز A وتم ملاحظة الأعراض المرضية ونسبة الموت وأظهرت النتائج ان أفراد المجموعة الأولي التي تم حقنها بال PBS بدأت تموت بداية من اليوم الثاني للعدوي وفي خلال ٤٨ ساعة تم موت جميع أفراد هذه المجموعة وكانت نسبة الموت في أفراد المجموعة الثانية المحصنة بالفاكسين التجاري ٤٠% ونسبة الموت في أفراد المجموعة الثالثة المحصنة بالبلازميد فقط ٧٠% بينما كانت نسبة الموت في المجموعة المحصنة بالبلازميد المحتوي علي جين المناعة (اللقاح الجيني) ١٠% .

١٠- تم تشريح بعض أفراد المجاميع التي ظهرت عليها أعراض مرضية مثل الضعف وعدم القدرة علي الحركة وضيق النتفس والترنح قبل موتها وملاحظة الشكل المظهري للرئتين والقلب ومقارنته بالرئتين والقلب لفئران سليمة غير مصابة بالبكتيريا أن هناك أعراض مرضية شديدة في مجاميع الكنترول والبلازميد واعراض مظهرية اقل في الحدة في مجموعة اللقاح التجاري والفاكسين الجيني وتؤكد تللك النتائج علي الحماية التي وفرها اللقاح الجيني من الاصابة ببكتيريا الباستريلا مالتوسيدا.